

МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ ПРИ СТРЕССЕ И АДАПТАЦИИ К ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ

О.И. Грабельных^{1,2}, Т.П. Побежимова¹, Н.С. Забанова^{1,2},
О.А. Боровик¹, В.К. Войников¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет,

Иркутск, e-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Митохондрии играют важную роль в энергетическом метаболизме растительной клетки, в процессах адаптации и гибели при стрессе. В нефотосинтезирующих частях растений митохондрии и их электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) вносят основной вклад в продукцию активных форм кислорода (АФК) в клетке (Møller, 2001). При стрессе повышение концентрации АФК в клетке до определенного уровня приводит к запуску защитных реакций (адаптации), а избыточная генерация АФК – к запуску программы клеточной гибели (Креславский и др., 2012; Suzuki, Mittler, 2006). Одним из факторов, вызывающих развитие окислительного стресса в растительных клетках, является неблагоприятная температура – как высокая, так и низкая (Грабельных и др., 2014б; Федяева и др., 2014). Повышение устойчивости растений к перенесению неблагоприятных низких температур происходит в результате низкотемпературной адаптации (холодового закаливания), а к действию же высоких температур – с помощью механизма индуцированной термотолерантности. При низкотемпературной адаптации повышение содержания АФК сопровождается активацией экспрессии ряда холодо-регулируемых генов (cold-regulated, COR-генов) (Suzuki, Mittler, 2006), также как при действии умеренно высокой температуры АФК активируют экспрессию генов белков теплового шока (БТШ) (Volkov et al., 2006). На этиолированных проростках озимой пшеницы показано, что митохондрии являются основным источником генерации АФК при температурном стрессе (Грабельных и др., 2014б). АФК, образующиеся в митохондриях, могут выступать в качестве сигнальных молекул, участвующих в передаче внутриклеточных сигналов, регуляции экспрессии стрессовых генов и активации защитных систем клетки или запуске программ клеточной гибели (Gray et al., 2004; Rhoads et al., 2006). Альтернативные ферменты ЭТЦ митохондрий растений (альтернативная оксидаза (АО) и альтернативные ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы (НАД(Ф)·Н-ДГ типа II – NDA, NDB)), а также свободные жирные кислоты (СЖК) и связанные с ними разобщающие белки (подобные термогенину животных, UCP-подобные белки) могут регулировать образование АФК в митохондриях и клетке, участвуя в реализации защитной программы или программы клеточной гибели (Грабельных, 2005; Грабельных и др., 2014а). В настоящей работе нами проведен сравнительный анализ функционального состояния митохондрий при действии на растения низких и высоких закаливающих и повреждающих температур, на основании таких параметров как содержание в митохондриях АФК, интактность наружной мембраны, окислительная и фосфорилирующая активность, содержание стрессовых белков, содержание и активность альтернативных ферментов ЭТЦ. Обсуждается связь между функциональной активностью растительных митохондрий при гипо- и гипертермии, жизнеспособностью растений и синтезом стрессовых белков.

В качестве объекта исследования использовали этиолированные проростки озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт «Иркутская»). Закаливание 3-х сут проростков к низкой температуре проводили при 2 °С в течение 7 сут, к высокой – при 37 °С в течение 2 и 24 ч. Холодовой шок вызывали действием на проростки отрицательной температуры -8 °С (6 ч), тепловой шок – действием высокой температуры 47 °С (30 мин).

Анализировали жизнеспособность проростков, содержание в тканях побегов АФК и стрессовых белков (дегидринов, БТШ), содержание в митохондриях АФК, проницаемость наружной мембраны митохондрий для экзогенного цитохрома *c*, окислительную и фосфорилирующую активность изолированных из побегов проростков митохондрий (дыхание в состояниях 3 и 4, коэффициент дыхательного контроля – ДК, АДФ:О, транспорт электронов по цитохромному и альтернативному путям), содержание в митохондриях дегидринов, БТШ, АО, NDA, NDB, UCP.

Установлено, что холодовой шок приводит к гибели проростков озимой пшеницы, сопровождающейся значительным повышением генерации АФК в тканях побегов и в изолированных из них митохондриях (Грабельных и др., 2014б). Обнаружена прямая зависимость между генерацией АФК и степенью интактности митохондрий, их окислительной и фосфорилирующей активностью. Вероятной причиной ингибирования окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий был выход цитохрома *c* из митохондрий. Установлено резкое снижение скорости окисления митохондриями малата, что указывает на повреждение комплекса I ЭТЦ митохондрий при гипотермии. Снижение окислительной активности митохондрий при холодовом шоке сопровождалось ингибированием активности АО и UCP-подобных белков. Холодовое закаливание проростков озимой пшеницы повышало морозоустойчивость, индуцировало синтез дегидринов (в том числе в митохондриях), снижало генерацию АФК при последующем холодовом шоке как в интактных тканях, так и в изолированных митохондриях. В результате этих событий сохранялась целостность мембран митохондрий и способность органелл осуществлять окислительное фосфорилирование при холодовом шоке. Холодовое закаливание активировало транспорт электронов через АО, индуцировало повышение в митохондриях содержания белков АО и UCP1/2, которые, вероятно, участвуют в поддержании необходимого про/антиоксидантного статуса клеток при гипотермии.

Тепловой шок снижал выживаемость проростков озимой пшеницы, приводил к генерации АФК в тканях побегов и в изолированных из них митохондриях. Повышение содержания АФК в митохондриях сопровождалось снижением интактности мембран митохондрий, резким ингибированием их окислительной и фосфорилирующей активности. Так же как и при действии низкой температуры, обнаружено значительное снижение окислительной активности митохондрий при окислении малата, что указывает на то, что комплекс I ЭТЦ митохондрий – НАДН: убихинон оксидоредуктаза является критическим звеном среди компонентов дыхательной цепи в ответной реакции на температурный стресс. Все негативные последствия теплового шока предотвращались предварительным воздействием на проростки закаливающей температуры (37°C). Воздействие этой температурой в течение 2 и, особенно, 24 часов, приводило к росту теплоустойчивости, связанному с синтезом БТШ (Hsp101, Hsp70, Hsp17,6) в тканях побегов. Эти изменения, наряду с повышением содержания в митохондриях белка и активности АО (через 24 ч воздействия), вероятно, способствовали снижению генерации АФК и сохранению интактности и окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий при последующем тепловом шоке. Поскольку Hsp101 и Hsp17,6 обнаруживались в митохондриях, то можно предполагать, что от взаимодействия БТШ с митохондриями зависит функционирование дыхательной цепи и способность растительных клеток адаптироваться к гипертермии. Примечательно, что на начальном этапе теплового закаливания (2 ч) активность «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-ДГ и «внешней» НАДФ-Н-ДГ снижалась, а затем по мере увеличения длительности закаливания (24 ч) возвращались до контрольного уровня. Следует заметить, что аналогичные изменения в активности данных ферментов наблюдали при холодовом закаливании озимой пшеницы (Грабельных и др., 2014а). Высокая скорость окисления экзогенного НАД·Н в митохондриях озимой пшеницы при холодовом и тепловом воздействиях указывает на важную роль «внешней» НАД·Н-ДГ в поддержании функционального состояния митохондрий в гетеротрофных тканях растений при гипо- и гипертермии.

Таким образом, для выживаемости растительных клеток при гипо- и гипертермии важную роль играет их способность синтезировать стрессовые белки, ограничивать развитие окислительного стресса и сохранять функциональную активность митохондрий. Участие альтернативных ферментов дыхания (АО и NDB) необходимо для развития адаптивных реакций и функционирования клетки при температурном стрессе.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 15-04-06533-а.

Литература

Грабельных О.И. Энергетические функции растительных митохондрий в стрессовых условиях // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2005. – Т. 1. – С. 37–54.

Грабельных О.И., Боровик О.А., Таусон Е.Л., Побежимова Т.П., Катъшев А.И., Павловская Н.С., Королева Н.А., Любушкина И.В., Бацмаков В.Ю., Попов В.Н., Боровский Г.Б., Войников В.К. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы // Биохимия. – 2014а. – Т. 79. – С. 645–660.

Грабельных О.И., Кириченко К.А., Побежимова Т.П., Боровик О.А., Павловская Н.С., Любушкина И.В., Королева Н.А., Войников В.К. Влияние холодового шока на жирнокислотный состав и функциональное состояние митохондрий закаленных и незакаленных проростков озимой пшеницы // Биологические мембраны. – 2014б. – Т. 31. – С. 204–217.

Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов Вл.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – С. 163–178.

Федяева А.В., Степанов А.В., Любушкина И.В., Побежимова Т.П., Рихванов Е.Г. Тепловой шок индуцирует продукцию активных форм кислорода и повышает потенциал на внутренней митохондриальной мембране в клетках озимой пшеницы // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – С. 1476–1486.

Gray G.R., Maxwell D.P., Villarimo A.R., McIntosh L. Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species // Plant Cell Reports. – 2004. – V. 23. – P. 497–503.

Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Plant Physiology. – 2001. – V. 52. – P. 561–591.

Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling // Plant Physiology. – 2006. – V. 141. – P. 357–366.

Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiology Plantarum. – 2006. – V. 126. – P. 45–51.

Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schoffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis // Plant Molecular Biology. – 2006. – V. 61. – P. 733–746.